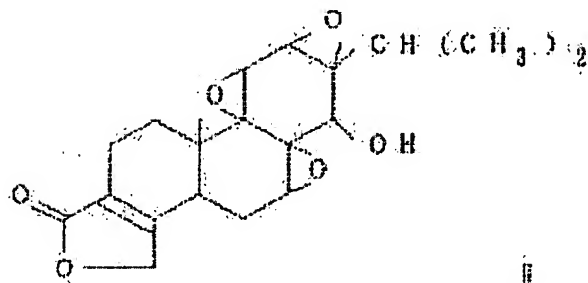
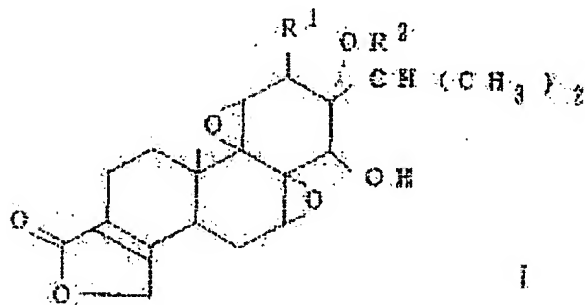


**DITERPENE LACTONE COMPOUND AND ITS PREPARATION****Patent number:** JP3178977 (A)**Publication date:** 1991-08-02**Inventor(s):** RU SHI YU; ZENGU JIA RAN; MA PENGU CHIENGU; ZANGU CHIYONGU PU; CHIEN YUN; YU DE KUAN; U RUO SHIYU; RIANGU SHIAO TEIAN; ZANGU ZENGU SHINGU**Applicant(s):** CHUGOKU IGAKU KAGAKUIN HIFUBIY; CHUGOKU IGAKU KAGAKUIN YAOBUTS**Classification:**

**- international:** C07D493/14; A61K31/365; A61K31/56; A61P29/00; A61P37/06; C07B39/00; C07B41/02; C07B45/06; C07D493/22; C07J71/00; A61K31/365; A61K31/56; C07B39/00; C07B41/02; C07B45/06; C07J71/00; C07D493/00; A61K31/365; A61K31/56; A61P29/00; A61P37/00; C07B39/00; C07B41/00; C07B45/00; C07J71/00; A61K31/365; A61K31/56; C07B39/00; C07B41/00; C07B45/00; C07J71/00; (IPC1-7): A61K31/365; A61K31/56; C07B39/00; C07B41/02; C07B45/06; C07J71/00; C07D493/14; C07D493/22

**- european:****Application number:** JP19900213608 19900810**Priority number(s):** EP19890106941Q 19890908Abstract not available for **JP 3178977 (A)**

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

## ⑫ 公開特許公報(A) 平3-178977

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>C 07 D 493/14  
493/22

識別記号

庁内整理番号

7431-4C  
7431-4C※

⑬ 公開 平成3年(1991)8月2日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全8頁)

⑭ 発明の名称 ジテルペンラクトン化合物及びその製造方法

⑰ 特 願 平2-213608

⑱ 出 願 平2(1990)8月10日

優先権主張 ⑲1989年9月8日 ⑳中国(CN)㉑89106941.0

⑳ 発 明 者 ル シ ユ 中華人民共和国江ス省南京市太平メン外ジアン王ミアオ街  
100号㉑ 発 明 者 ゼン グ ジ ア ラ ン 中華人民共和国江ス省南京市太平メン外ジアン王ミアオ街  
100号㉒ 出 願 人 中国医学科学院皮フ病 中華人民共和国江ス省南京市太平メン外ジアン王ミアオ街  
研究所 100号㉓ 出 願 人 中国医学科学院ヤオ物 中華人民共和国北京市宣武区先ノンタン街1号  
研究所

㉔ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外3名

最終頁に続く

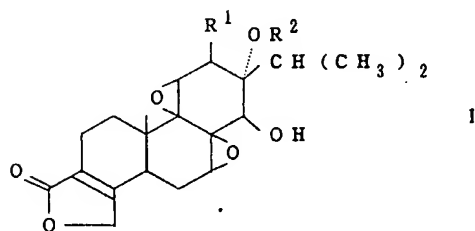
## 明 細 書

## 1. 発明の名称

ジテルペンラクトン化合物及びその製造方法

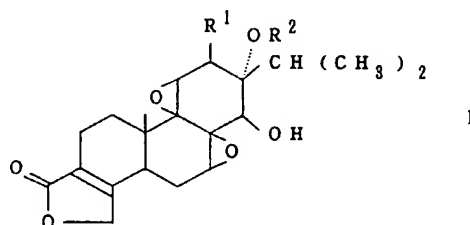
## 2. 特許請求の範囲

(1) 下記式 I

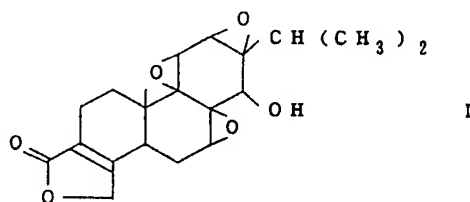


(式中、R¹ はハロゲン原子、水酸基、メトキシ基またはプロピルチオ基を示し、R² は水素原子またはアセチル基を示す。) で表わされるジテルペンラクトン化合物。

(2) 下記式 I



(式中、R¹ はハロゲン原子、水酸基、メトキシ基またはプロピルチオ基を示し、R² は水素原子またはアセチル基を示す。) で表わされるジテルペンラクトン化合物を製造するにあたり、下記式 II



で表わされるトリブトライドと式 R¹-H (式中、R¹ は前記と同意義である。) で表わされる化合

物を反応させ、または更にこの生成物を無水酢酸と反応させることを特徴とするジテルペンラクトン化合物の製造方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### <産業上の利用分野>

本発明は新規な抗炎症および免疫抑制作用を有するジテルペンラクトン化合物及びその製造方法に関する。

#### <従来の技術>

従来のジテルペンラクトン化合物としてはトリプトライドがあり、この化合物は主として中国に分布する *Tripterygium Wilfordii* の根部から得られるものである。この化合物は抗腫瘍作用を有することが報告されている [J. Amer. Chem. Soc., 第94巻, 第7194頁(1972年)]。

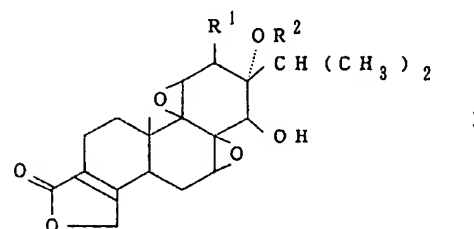
#### <発明が解決しようとする課題>

本発明者らは、トリプトライドの3つのエポキシドのうち1つのエポキシドのみを一定の条件にて開裂し、または更にこの生成物をアセチル化することにより新規なジテルペンラクトン化合物を

製造し、これらが優れた抗炎症および免疫抑制作用を有することを見出し、本発明を完成した。

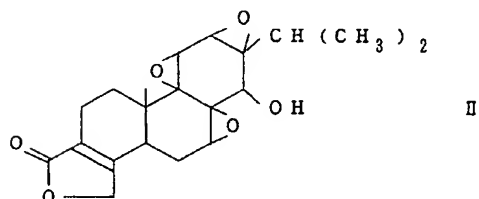
#### <課題を解決するための手段>

すなわち、本発明は、下記式 I



(式中、 $R^1$  はハロゲン原子、水酸基、メトキシ基またはプロピルチオ基を示し、 $R^2$  は水素原子またはアセチル基を示す。)

で表わされるジテルペンラクトン化合物；及び該ジテルペンラクトン化合物を製造するにあたり、下記式 II



で表わされるトリプトライドと式  $R^1-H$  (式中、 $R^1$  は前記と同意義である。) で表わされる化合物を反応させ、または更にこの生成物を無水酢酸と反応させることを特徴とするジテルペンラクトン化合物の製造方法である。

本発明において、ハロゲン原子とはフッ素原子、塩素原子、臭素原子またはヨウ素原子である。

式  $R^1-H$  で表される化合物の具体例としては、塩化水素、臭化水素、ヨウ化水素などのハロゲン化水素、メタノール、プロパンチオールなどが挙げられる。

トリプトライドと式  $R^1-H$  の化合物とを反応させる際の反応条件は、用いる化合物の種類に応じてそれぞれ異なるが、通常、温和な条件で反応

を完了することができる。反応温度は、冷蔵庫内で2〜3℃、あるいは室温ないし70℃で、反応を進行させることができる。反応溶媒も通常使用される溶媒を用いることができ、例えばエチルエーテル、メタノール、アセトン、ジクロロメタンなどが挙げられる。反応時間は、短い場合には20〜30分程度であり、長い場合には2週間程度である。更に、得られる生成物に無水酢酸を反応させて  $R^2$  がアセチル基である式 I の化合物を得ることができる。この反応は無水酢酸を含有するピリジン溶媒中で室温で数日間放置することにより実施可能である。

本発明の製造方法で得られる式 I のジテルペンラクトン化合物を例示すれば下記のとおりであり、これらは抗炎症および免疫抑制作用を有し、抗炎症剤および免疫抑制剤として極めて有用である。

化合物 a ;  $R^1$  = 塩素原子、

$R^2$  = 水素原子の化合物

化合物 b ;  $R^1$  = 臭素原子、

$R^2$  = 水素原子の化合物

化合物 c :  $R^1$  = メトキシ基、

$R^2$  = 水素原子の化合物

化合物 d :  $R^1$  = 水酸基、

$R^2$  = 水素原子の化合物

化合物 e :  $R^1$  = プロピルチオ基、

$R^2$  = 水素原子の化合物

化合物 f :  $R^1$  = 塩素原子、

$R^2$  = アセチル基の化合物。

#### <実施例>

以下、実施例にて本発明化合物及びその製造方法を詳細に説明する。

#### 実施例 1 [化合物 a の製造]

トリブトライド 20 mg に 0.4 規定塩酸-水酢酸 (36% 塩酸 0.35 ml を 1 ml の水酢酸に溶解した) 1 ml を加え、蓋をして冷蔵庫 (3-4℃) に 16~18 時間放置した。反応液に 5 倍量の水を加え、エーテルで 3 回抽出した。エーテル層を合わせ、水で中性になるまで洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾過して除き、エーテルを留去した。残渣を分取シリ

カゲル薄層クロマトグラフィー (展開溶媒 ; 2% エタノール/クロロホルム) で分離して化合物 a を含む画分を収集し、5% エーテル/クロロホルムで溶出して化合物 a の粗画分を得、それをクロロホルムで再結晶して化合物 a の白色針状結晶 18 mg を得た。収率 82%。

m. p. 256~258℃

MS m/z (%) ;

396 ( $M^+$ , 0.88),

378 (0.42), 361 (1.88),

343 (34.91) 273 (17.06),

247 (39.04), 229 (17.33),

149 (26), 121 (23),

105 (32), 71 (100)

$IR \quad \nu \quad \frac{KB}{max} \quad cm^{-1}$  ;

3530 (水酸基),

1751, 1673 ( $\alpha, \beta$ -不飽和  $\gamma$ -ラク  
トン)

$^1H-NMR$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) ;

- 8 -

0.89 (3H, d,  $J=6.97$  Hz,

$C_{16}-3H$ ),

1.00 (3H,  $J=6.60$  Hz,

$C_{17}-3H$ ),

1.12 (3H, s,  $C_{20}-3H$ ),

1.27, 1.61 (2H,  $C_1-2H$ ),

1.98 (1H, t,  $C_6-\beta H$ ),

2.17, 2.32 (2H,  $C_2-2H$ ),

2.20 (1H, m,  $C_6-\alpha H$ ),

2.56 (1H, sept,  $C_{15}-H$ ),

2.75 (1H, m,  $C_5-H$ ),

3.12 (1H, d,  $J=1.46$  Hz,

$C_{14}-H$ ),

3.45 (1H, d,  $J=5.86$  Hz,

$C_7-H$ ),

3.90 (1H, d,  $J=5.13$  Hz,

$C_{11}-H$ ),

4.26 (1H, dd,  $J=5.13$ ,

1.46 Hz,  $C_{12}-H$ ),

4.74 (2H, m,  $C_{19}-2H$ )

- 9 -

$^{13}C-NMR$  (400 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm) ;

13.27 (q,  $C_{20}$ ),

15.17 (q,  $C_{16}$ ),

15.38 (q,  $C_{17}$ ),

17.01 (t,  $C_2$ ),

23.26 (t,  $C_6$ ),

28.98 (d,  $C_{15}$ ),

30.41 (d,  $C_1$ ),

35.74 (s,  $C_{10}$ ),

39.88 (d,  $C_5$ ),

57.66 (d,  $C_{11}$ ),

59.08 (d,  $C_{12}$ ),

61.31 (d,  $C_7$ ),

70.74 (t,  $C_{19}$ )

76.24 (d,  $C_{14}$ )

125.27 (s,  $C_3$ ),

161.20 (s,  $C_4$ ),

174.19 (s,  $C_{18}$ ), 60.51,

70.20, 76.58 ( $C_8, C_9, C_{13}$ )

構造は単結晶 X 線回折法でも証明した。

- 10 -

## 実施例 2 [化合物 b の製造]

20 mg のトリブトライドを 15 ml のアセトンに溶解し、1 ml の水と 0.5 ml の濃臭化水素を加えて 25 分間還流した。反応後、30 ml の水を加え、減圧してアセトンを一部除去した後、ジクロロメタン 15 ml で 3 回抽出した。ジクロロメタン層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下ジクロロメタンを留去し、残留物をジクロロメタン-石油エーテルで再結晶して化合物 b の板状結晶 18 mg を得た。収率 75%。

m. p. 230~232℃

シリカゲル薄層クロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム: エタノール = 95:5);

R<sub>f</sub> = 0.64

Kedde's 発色剤; 紫紅色

元素分析;

計算値 (%) C 54.55, H 5.68,

Br 17.95

実測値 (%) C 54.25, H 5.79,

Br 18.93

- 11 -

MS m/z (%) 361 (M<sup>+</sup> - Br, 3),  
343 (M<sup>+</sup> - Br - H<sub>2</sub>O, 14),  
325 (5), 271 (9), 241 (9),  
189 (18), 167 (23),  
151 (27), 137 (84),  
43 (100)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm);  
0.88 (3H, d, J = 7 Hz, C<sub>16</sub>-3H),  
0.98 (3H, d, J = 7 Hz, C<sub>17</sub>-3H),  
1.11 (3H, s, C<sub>20</sub>-3H),  
1.22 (1H, m),  
1.61 (1H, q, J = 4, 12 Hz),  
2.00 (1H, m),  
2.15 (1H, m), 2.33 (1H, m),  
2.62 (2H, m),  
3.14 (1H, s, C<sub>14</sub>-H),  
3.38 (1H, d, J = 6 Hz, C<sub>7</sub>-H),  
3.84 (1H, d, J = 4 Hz, C<sub>11</sub>-H),  
4.14 (1H, d, J = 4 Hz, C<sub>12</sub>-H),  
4.68 (2H, br. s, C<sub>19</sub>-2H)

- 12 -

## 実施例 3 [化合物 c の製造]

2 g の中性酸化アルミニウム (400℃で 3 時間放置) に 150 μl の無水メタノールを加え 20 分間撹拌した。30 mg のトリブトライドを 40 ml の無水ジクロロメタンで溶解した液を先の酸化アルミニウム中に加え、室温で 10 時間放置後、1 ml の無水メタノールを撹拌下に加え、室温で 1 週間放置した。反応液を濾過し、メタノールで酸化アルミニウムを洗い、メタノール液を合わせ、メタノールを留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム) に付し、第 5 画分 (20 ml/画分) より目的物を分離した。これをジクロロメタン-石油エーテルで再結晶して化合物 c の針状結晶 3 mg を得た。収率 10%。

m. p. 272~274℃

シリカゲル薄層クロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム: メタノール = 95:5);

R<sub>f</sub> = 0.75

Kedde's 発色剤; 紫紅色 (斑点)

- 13 -

高分解質量スペクトル:

分子量 392.1837

分子式: C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>7</sub>

MS m/z (%)

392 (M<sup>+</sup>, 100),  
377 (M<sup>+</sup> - CH<sub>3</sub>, 43.89),  
271 (1.5)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm);  
0.90 (3H, d, J = 7 Hz, C<sub>16</sub>-3H),  
1.06 (3H, J = 7 Hz, C<sub>17</sub>-3H),  
1.17 (3H, s, C<sub>20</sub>-3H),  
1.58 (1H, q, J = 5, 12 Hz),  
1.93 (1H, m), 2.10 (1H, m),  
2.22 (2H, m), 2.35 (1H, m),  
2.91 (1H, m),  
3.44 (3H, s, OCH<sub>3</sub>),  
3.53 (1H, d, J = 3 Hz, C<sub>11</sub>-H),  
3.63 (1H, br. s, C<sub>14</sub>-H),  
4.34 (1H, d, J = 3 Hz, C<sub>12</sub>-H),  
4.71 (2H, br. s, C<sub>19</sub>-2H),

- 14 -

## 実施例 4 [化合物 d の製造]

20 mg のトリブトライドを 10 ml のメタノールに溶解し、蒸留水 5 ml、リン酸緩衝液 (pH 7.4) 5 ml およびジエチルアミン 200  $\mu$ l を加え、室温で攪拌して 1 週間放置した。反応液を 2 規定硫酸で中和し、20 ml の水を加えて希釈し、クロロホルム 10 ml で 4 回抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、留去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: 1% メタノール/クロロホルム) に付し、第 6 画分 (20 ml/画分) より目的物を分離した。これをアセトンで再結晶して化合物 d の白色粉末 16 mg を得た。収率 76%。

m. p. 180~182°C

シリカゲル薄層クロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム: メタノール = 95:5);

Rf = 0.50

Kedde's 発色剤: 紫紅色 (斑点)

MS m/z (%):

361 ( $M^+ + 1 - H_2O$ , 2)

— 15 —

を加えて希釈し、ジクロロメタン 10 ml で 4 回抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、留去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: 1% メタノール/クロロホルム) に付し、第 3 画分 (25 ml/画分) より目的物を分離した。これをジクロロメタン-石油エーテルで再結晶して針状結晶を 22 mg 得た。収率 61%。

m. p. 240~242°C

シリカゲル薄層クロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム: エタノール = 96:4);

Rf = 0.40

Kedde's 発色剤: 紫紅色 (斑点)

元素分析で硫黄を含有することが分った。

IR  $\nu_{max}^{KBr}$   $cm^{-1}$ :

3450 (水酸基),

1750, 1680 ( $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和  $\gamma$ -ラクトン)

MS m/z (%):

— 17 —

342 ( $M^+ - 2H_2O$ , 3), 317 (5),  
259 (7), 231 (9), 193 (7),  
151 (12), 71 (31), 43 (100)

$^1H-NMR$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):

0.69 (3H, d,  $J = 7$  Hz,  $C_{16}-3H$ ),

0.92 (3H, s,  $C_{20}-3H$ ),

0.94 (3H, d,  $J = 7$  Hz,  $C_{17}-3H$ ),

1.24 (1H, m),

1.38 (1H, q,  $J = 4.12$  Hz),

2.13 (1H, m), 2.28 (2H, m),

2.85 (1H, m),

3.46 (1H, d,  $J = 2$  Hz,  $C_{11}-H$ ),

3.56 (1H, d,  $J = 6$  Hz,  $C_7-H$ ),

4.31 (1H, d,  $J = 2$  Hz,  $C_{12}-H$ ),

4.76 (2H, m,  $C_{19}-2H$ )

## 実施例 5 [化合物 e の製造]

30 mg のトリブトライドを 3.5 ml のメタノールに溶解し、リン酸緩衝液 (pH 7.4) 3.5 ml およびプロピルチオール 400  $\mu$ l を加え、室温で攪拌して 2 週間放置した。反応液に 20 ml の水

— 16 —

437 ( $M^+ + 1$ , 7), 436 ( $M^+$ , 2),  
389 (5), 343 (7), 315 (63),  
273 (9), 160 (26), 71 (29),  
43 (100)

$^1H-NMR$  (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )

$\delta$  (ppm):

0.75 (3H, d,  $J = 6$  Hz,  $C_{16}-3H$ ),

0.92 (3H, d,  $J = 6$  Hz,  $C_{17}-3H$ ),

0.94 (3H, s,  $C_{20}-3H$ ),

0.98 (3H, t,  $J = 6$  Hz,

$CH_3CH_2CH_2S-$ ),

1.27 (1H, m,  $C_1-\alpha H$ ),

1.41 (1H, q,  $J = 5.12$  Hz,

$C_1-\beta H$ ),

1.60 (2H, m,  $CH_3CH_2CH_2S-$ ),

1.82 (1H, q,  $J = 13.15$  Hz,

$C_6-\beta H$ ),

1.98 (1H, m,  $C_2-\beta H$ ),

2.13 (1H, m,  $C_2-\alpha H$ ),

2.17 (1H, m,  $C_6-\alpha H$ ),

— 18 —

2. 21 (1 H, m,  $C_{15}-H$ ),  
 2. 65 (2 H, m,  $-CH_2-S-$ ),  
 2. 7 (1 H, m),  
 2. 87 (1 H, d,  $J=8.5$  Hz),  
 3. 16 (1 H, d,  $J=5$  Hz,  $C_{12}-H$ ),  
 3. 34 (1 H, d,  $J=6$  Hz,  $C_7-H$ ),  
 3. 73 (1 H, d,  $J=5$  Hz,  $C_{11}-H$ ),  
 4. 83 (2 H, m,  $C_{19}-2H$ ),

## 実施例 6 [化合物 f の製造]

20 mg の化合物 a を 1 ml のピリジンに溶かし、更に 1 ml の無水酢酸を加えて 1 週間放置した。反応液を 20 ml の氷水中に注ぎ、ジクロロメタン 15 ml で 3 回抽出した。ジクロロメタン層を合わせ、10 ml の水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、留去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒：2% メタノール）に付し、第 3 画分（15 ml / 画分）より目的物を分離した。これをジクロロメタン-石油エーテルで再結晶し化合物 f の板状結晶 18 ml を得た。収率 61%。

- 19 -

3. 80 (1 H, d,  $J=4$  Hz,  $C_{11}-H$ ),  
 4. 12 (1 H, d,  $J=4$  Hz,  $C_{12}-H$ ),  
 4. 68 (2 H, m,  $C_{19}-2H$ ),  
 構造は単結晶 X 線回折法で証明した。

## &lt; 試験例 &gt;

本発明の方法で合成したジテルペンラクトン化合物は溶血素抗体生成試験およびリンパ球幼若化反応試験 (LTT) において、優れた抗炎症および免疫抑制作用を有することが確認された。試験方法及びその結果は以下の通りである。

## 試験例 1 マウスの脾臓リンパ細胞幼若化反応に対する抑制作用

体重 18~22 g の  $C_{57}$  系雄性マウスを用いた。脾臓を無菌的に摘出し、細切後 Hank's 培養液に浮遊し、3 回洗浄後、1640 培養液で  $7 \times 10^6$  個細胞/ml に調整した。96 ウェルプレートで、各ウェルに 50  $\mu$ l のこの細胞液を加え、ブランク対照を除いた各ウェルに 50  $\mu$ l (0.125  $\mu$ g) の Con A を加え、試験ウェルに 50  $\mu$ l の試験サンプルを同時に添加した。各ウェルに

- 21 -

m. p. 194~196 °C

シリカゲル薄層クロマトグラフィー（展開溶媒：クロロホルム：エタノール=95:5）；

Rf = 0.55

Kedde's 発色剤；紫紅色（斑点）

MS m/z (%) ;

439 ( $M^+ + 1$ , 3),395 ( $M^+ - COCH_3$ , 3),

343 (16), 247 (23),

151 (14), 71 (30), 43 (100)

 $^1H-NMR$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) ;0.91 (3 H, d,  $J=7$  Hz,  $C_{16}-3H$ ),1.03 (3 H, d,  $J=7$  Hz,  $C_{17}-3H$ ),1.07 (3 H, s,  $C_{20}-3H$ ),

1.27 (1 H, m), 1.64 (1 H, m),

1.98 (1 H, t,  $J=13$  Hz),2.14 (3 H, s,  $-COCH_3$ ),

2.23 (1 H, m), 2.35 (1 H, m),

2.75 (1 H, m,  $C_5-H$ ),3.50 (1 H, d,  $J=6$  Hz,  $C_7-H$ ),

- 20 -

640 培養液を添加した後 200  $\mu$ l の最終体積に調整した。すなわち各試験サンプルはブランク対照ウェルおよび刺激対照ウェル (Con A) を設定し、各試験群はウェル 4 個がある。上述細胞を 37 °C、5%  $CO_2$ 、48 時間培養した後、各ウェルに 20  $\mu$ l (0.3  $\mu$ Cl) の  $^3H-TdR$  を添加し、6 時間継続培養した。培養終了後細胞を濾紙に吸着させ、80 °C 乾燥後  $^3H-TdR$  取り込み量を測定した。下記計算式により  $^3H-TdR$  取り込み阻害率を算定した。

阻害率 (%)

$$= \frac{\text{刺激対照ウェル cpm} - \text{試験サンプルウェル cpm}}{\text{刺激対照ウェル cpm}}$$

 $\times 100$ 

- 22 -

グループ	薬物濃度 (mg/ml)	CPM(X±SE)	阻害率
ブランク対照		1061.0±238.8	
刺激対照		47197.7±5039.5	
化合物 c	1×10 <sup>-5</sup>	48223.0±3956.1	-2.2
	1×10 <sup>-4</sup>	57626.8±7145.9	-22.0
	1×10 <sup>-3</sup>	16364.3±1835.3*	65.3
	1×10 <sup>-2</sup>	904.8±244.8**	98.1
	1×10 <sup>-1</sup>	487.3±109.1**	99.0
ブランク対照		1218.5±139.0	
刺激対照		41997.5±4664.7	
化合物 f	1×10 <sup>-5</sup>	6011.5±277.6**	85.7
	1×10 <sup>-4</sup>	629.5±141.6**	98.5
	1×10 <sup>-3</sup>	606.0±136.9*	98.6
	1×10 <sup>-2</sup>	345.5±103.1**	99.1
	1×10 <sup>-1</sup>	221.0±53.9**	99.5

- 23 -

群マウスに生理食塩水を、試験群マウスにサンプル溶液を一回/日×4日腹腔注射した。免疫した後5日目に眼球から採血し、血清を分離し、稀釈した。この稀釈後血清にSRBC及びモルモットの血清を添加し、37℃、10分間培養を行った。溶血が発生した後この上清を取り、Drabkin's 試薬を加え、血清が赤褐色になった。この血清を540nmに測定して、同時に半数のSRBC溶血O.D.値を測定して、下記計算式により半数溶血値(HC<sub>50</sub>)を算定した。HC<sub>50</sub>で血清の溶血素抗体レベルを表示した。

サンプルHC<sub>50</sub>

$$= \frac{\text{サンプルのO.D.}}{\text{SRBC半数溶血のO.D.}} \times \text{血清の稀釈倍数}$$

- 25 -

ブランク対照		889.3±60.7	
刺激対照		24106.0±4596.9	
化合物 b	1×10 <sup>-12</sup>	413.0±172.0*	98.3
	1×10 <sup>-10</sup>	397.8±43.6*	98.3
	1×10 <sup>-8</sup>	282.8±30.5*	98.8
	1×10 <sup>-6</sup>	182.3±50.8*	99.2
ブランク対照		787.5±126.5	
刺激対照		24011.3±2525.5	
化合物 a	1×10 <sup>-12</sup>	1781.5±326.9**	92.8
	1×10 <sup>-10</sup>	21747.3±3723.2	9.4
	1×10 <sup>-8</sup>	7545.3±1806.4*	68.8
	1×10 <sup>-6</sup>	1642.3±618.2**	93.2

\* : P &lt; 0.01    \*\* : P &lt; 0.001

## 試験例2 マウスの溶血素抗体生成に対する作用

体重20～24gの昆明種マウスを使用した。0.2ml(2×10<sup>9</sup>個細胞/ml)のヒツジ赤血球(SRBC)を腹腔投与し、4時間後これらのマウスを対照群及び試験群に随意に分けた。対照

- 24 -

グループ	投与量 (mg/kg)	H C <sub>50</sub>	阻害率 (%)
対照		32.8±8.0	
シクロホス			
ファミド	10	4.1±1.1	91.9**
化合物 c	0.1	11.7±2.6	64.3**
f	0.1	15.3±3.0	53.3**
b	0.1	5.4±1.2	83.6**
a	0.1	6.8±1.4	79.4**

\* : P &lt; 0.05    \*\* : P &lt; 0.001

代理人 浅 村 皓

- 26 -



第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>5</sup>		識別記号	序内整理番号
// A 61 K	31/365	A B E	7475-4C
	31/56	A B C	7252-4C
C 07 B	39/00		7457-4H
	41/02		7457-4H
	45/06		7457-4H
C 07 J	71/00		6859-4C
⑦発明者	マ ベング チェング		中華人民共和国江ス省南京市太平メン外ジアン王ミアオ街 100号
⑦発明者	ザング チョング ブ		中華人民共和国江ス省南京市太平メン外ジアン王ミアオ街 100号
⑦発明者	チ エ ン ユ ン		中華人民共和国江ス省南京市太平メン外ジアン王ミアオ街 100号
⑦発明者	ユ デ ク アン		中華人民共和国北京市宣武区先ノンタン街1号
⑦発明者	ウ ル オ シ ユ		中華人民共和国北京市宣武区先ノンタン街1号
⑦発明者	リアング シアオ テ イアン		中華人民共和国北京市宣武区先ノンタン街1号
⑦発明者	ザング ゼング シン グ		中華人民共和国北京市宣武区先ノンタン街1号